



AI

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING NUCLEIC ACIDS, PREPARATION AND USES

(54) Titre: COMPOSITION CONTENANT DES ACIDES NUCLEIQUES, PREPARATION ET UTILISATIONS

(57) Abstract

The present invention relates to compositions comprising at least one nucleic acid and one lipopolyamine, and their utilisation in gene therapy, particularly for the transfert *in vivo* of nucleic acids.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des compositions comprenant au moins un acide nucléique et une lipopolyamine, et leur utilisation en thérapie génique, notamment pour le transfert *in vivo* d'acides nucléiques.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | GB | Royaume-Uni | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | GE | Géorgie | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GN | Guinée | NE | Niger |
| BE | Belgique | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BF | Burkina Faso | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BG | Bulgarie | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BJ | Bénin | IT | Italie | PL | Pologne |
| BR | Brésil | JP | Japon | PT | Portugal |
| BY | Bélarus | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| CA | Canada | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KZ | Kazakhstan | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LK | Sri Lanka | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CS | Tchécoslovaquie | LV | Lettanie | TG | Togo |
| CZ | République tchèque | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DE | Allemagne | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| DK | Danemark | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | UZ | Ouzbékistan |
| FR | France | | | VN | Viet Nam |
| GA | Gabon | | | | |

COMPOSITION CONTENANT DES ACIDES NUCLEIQUES,
PREPARATION ET UTILISATIONS

La présente invention concerne des compositions à base d'acides nucléiques, leur préparation et leur utilisation. Plus particulièrement, elle concerne des 5 compositions comprenant au moins un acide nucléique et une lipopolyamine et leur utilisation en thérapie génique, notamment pour le transfert d'acides nucléiques.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) ou à assurer l'expression d'une protéine d'intérêt thérapeutique par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe 10 affecté. Cette information génétique peut être introduite soit *in vitro* dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement *in vivo* dans le tissu approprié. Différentes techniques ont été décrites pour le transfert de cette information génétique, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran 15 (Pagano et al., J.Viro. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), d'ADN et de polylysine, l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de 20 gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physicochimiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Toutefois, les techniques développées jusqu'à présent ne permettent pas de résoudre de manière satisfaisante les difficultés liées au transfert de gènes dans les 25 cellules et/ou l'organisme. En particulier, les problèmes liés à la pénétration de l'acide nucléique dans les cellules ne sont pas entièrement résolus. En effet, la nature polyanionique des acides nucléiques prévient leur passage à travers les membranes cellulaires. S'il a été montré que les acides nucléiques nus sont capables de traverser la membrane plasmique de certains types cellulaires *in vivo* (voir notamment la demande 30 n° WO90/11092), l'efficacité de transfection reste assez faible. De plus, les acides nucléique nus ont une demi-vie plasmatique courte, en raison de leur dégradation par les enzymes et de leur élimination par les voies urinaires. Par ailleurs, si les virus recombinants permettent d'améliorer l'efficacité de transfert des acides nucléiques, leur

emploi présente certains risques tels que la pathogénicité, la transmission, la réPLICATION, la recombinaison, la transformation, l'immunogénicité, etc.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ces différents problèmes. La demanderesse a en effet montré que certaines compositions comprenant un acide nucléique et une lipopolyamine peuvent permettre le transfert *in vivo* dudit acide nucléique dans une cellule et/ou un organe avec une grande efficacité et sans toxicité. Les compositions de l'invention permettent également d'éviter les inconvénients liés à l'emploi de vecteurs viraux (dangers potentiels, taille limitée du gène transféré, prix élevé, etc).

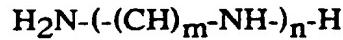
L'utilisation de certaines lipopolyamines pour transfecter *in vitro* des cultures cellulaires a déjà été décrite dans l'art antérieur. Ainsi, la demande EP 394 111 décrit l'utilisation de certaines lipopolyamines pour la transfection de lignées cellulaires *in vitro*. De même, l'article de Demeneix et al (Int. J. Dev. Biol. 35 (1991) 481) décrit l'utilisation d'une lipopolyamine (la dioctadécylamidoglycyl spermine, DOGS) pour la transfection d'acides nucléiques *in ovo*. Selon ces documents, les lipopolyamines doivent être utilisées dans des conditions telles que le rapport charges positives de la lipopolyamine / charges négatives de l'acide nucléique soit compris entre 2 et 5, et de préférence égal à 3 ou 4. Cependant, comme le montrent les exemples 8 et 9 de la présente demande, de manière surprenante, aucune des conditions décrites dans ces documents ne permet la transfection d'acides nucléiques *in vivo*. En raison d'interaction avec des macromolécules anioniques ou avec la matrice extracellulaire des tissus, les particules formées dans ces conditions sont en effet incapables de diffuser hors du site d'application, et donc de transférer tout acide nucléique *in vivo*. De plus, les conditions de préparation décrites dans ces documents ne sont pas applicables à la réalisation de compositions pharmaceutiques contenant des quantités importantes d'acides nucléiques. La demanderesse a maintenant montré que, dans certaines conditions, les lipopolyamines peuvent être utilisées pour la transfection *in vivo* d'acides nucléiques. Plus particulièrement, la demanderesse a trouvé que, de manière surprenante, des compositions comprenant un acide nucléique et une lipopolyamine dans des conditions telles que le rapport charges positives de la lipopolyamine / charges négatives de l'acide nucléique soit inférieur ou égal à 2 permettent la transfection dudit acide nucléique *in vivo* avec une grande efficacité. De plus, la demanderesse a mis au point certaines conditions permettant la préparation de ces compositions pharmaceutiques incorporant des quantités importantes d'acide

nucléique. Les compositions pharmaceutiques de l'invention constituent ainsi des outils particulièrement avantageux pour l'administration et le transfert d'acides nucléiques *in vivo*.

Un premier objet de l'invention réside donc dans une composition comprenant
5 au moins un acide nucléique et une lipopolyamine, dans laquelle le rapport R = charges positives de la lipopolyamine / charges négatives de l'acide nucléique est inférieur ou égal à 2.

Au sens de la présente invention, le terme lipopolyamine désigne toute molécule amphiphile comprenant au moins une région hydrophile polyamine et une
10 région lipophile. La région polyamine des lipopolyamines, chargée cationiquement, est capable de s'associer de manière réversible avec l'acide nucléique, chargé négativement. Cette interaction compacte fortement l'acide nucléique. La région lipophile rend cette interaction ionique insensible au milieu externe, en recouvrant la particule nucléolipidique formée d'une pellicule lipidique.

15 Avantageusement, la région polyamine des lipopolyamines utilisées dans le cadre de l'invention répond à la formule générale



20 dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 2 et n est un nombre entier supérieur ou égal à 1, m pouvant varier entre les différents groupes de carbone compris entre deux amines. Préférentiellement, m est compris entre 2 et 6 inclusivement et n est compris entre 1 et 5 inclusivement. Encore plus préférentiellement, la région polyamine est représentée par la spermine ou un analogue de la spermine ayant conservé ses propriétés de liaison à l'ADN.

25 La région lipophile peut être une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, du cholestérol, un lipide naturel ou un lipide synthétique capables de former des phases lamellaires ou hexagonales.

30 Avantageusement, on utilise dans le cadre de la présente invention des lipopolyamines telles que définies dans la demande de brevet EP 394 111. Cette demande décrit également un procédé utilisable pour la préparation de ces lipopolyamines.

De manière particulièrement avantageuse, on utilise dans le cadre de l'invention la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) ou la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES).

Pour obtenir un effet optimum des compositions de l'invention, les proportions respectives de la polyamine et de l'acide nucléique sont de préférence déterminées de sorte que le rapport R charges positives de la lipopolyamine / charges négatives de l'acide nucléique soit compris entre 0,1 et 1,9; plus préférentiellement entre 0,5 et 1,5.

Dans les compositions de la présente invention, l'acide nucléique peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent par ailleurs être incorporés dans des vecteurs, tels que des vecteurs plasmidiques.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réPLICATION, des séquences antisens, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une

protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut 5 citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 10 05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), etc.

15 Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrtes dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans 20 le brevet EP 140 308. Les antisens comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

25 Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite 30 B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide

antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne des compositions comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et d'améliorer le pouvoir transfectant. La demanderesse a en effet montré que le pouvoir transfectant des lipopolyamines peut être de manière inattendue augmenté en présence de certains adjuvants (lipides ou protéines par exemple), capables de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique. Comme le montrent les exemples 4 à 7 de la présente demande, cette amélioration se manifeste aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

Plus préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent, comme adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres. De telles compositions sont particulièrement avantageuses, notamment lorsque le rapport R est faible. La demanderesse a en effet montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et, de manière surprenante, de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à 2 chaînes grasses.

De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions

physiologique. Ils peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), le oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), le di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamine ainsi que leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois; les 5 phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par 10 extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,1 à 20 15 équivalents d'adjivant pour 1 équivalent de lipopolyamine, et, plus préférentiellement, de 1 à 5.

Les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue 20 d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour 25 une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode 30 d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le traitement de maladies, comprenant l'administration *in vivo* d'un acide nucléique apte à corriger ladite maladie associé à une lipopolyamine dans les conditions définies ci-dessus. Plus particulièrement, cette méthode est applicable aux

maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique et l'acide nucléique administré code pour ledit produit protéique ou contient ledit produit nucléique.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples 5 qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

EXEMPLE 1 - Plasmides utilisés pour le transfert de gènes in vivo

Trois types de constructions ont été utilisées pour mettre en évidence l'activité des compositions de l'invention : Des plasmides comportant le gène codant pour la luciférase (Luc), des plasmides comportant le gène codant pour la β -galactosidase (gène LacZ) et des plasmides comportant le gène codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (CAT).
10

1.1. Plasmides comportant le gène Luc

Le plasmide pCMV-luc comporte le promoteur du Cytomégavirus (CMV), extrait du plasmide vecteur pcDNA3 (Invitrogen) par coupure avec les enzymes de restriction Mlu I et HindIII, situé en amont du gène codant pour la luciférase, inséré aux sites MluI et HindIII dans le vecteur pGL basic Vector (Promega).
15

1.2. Plasmides comportant le gène LacZ

Le plasmide pCMV- β Gal (Clontech) comporte le promoteur CMV situé en amont du gène LacZ codant pour la β -galactosidase d'*Escherichia coli*. Le vecteur 20 pSV-nls LacZ (pAOnlsLacZ) comporte le même promoteur, une séquence de localisation nucléaire (issue du virus SV40) localisée en phase et en amont du gène LacZ. Cette construction permet l'expression de la protéine de fusion nls- β -galactosidase dans le noyau des cellules (Cf De Luze et al., PNAS 90 (1993) 7322).

1.3. Plasmides comportant le gène CAT

Les plasmides ayant pour gène rapporteur le gène codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) sous contrôle des promoteurs RSV (pRSV-CAT) et SV40 (pSV40-CAT) ont été publiés (Boutiller et al., Prog. Neuro-PhychoPharmacol. et Biol. Psychiat. 16 (1992) 959; de Luze et al. PNAS 90 (1993) 25 7322).

EXAMPLE 2 - Transfert d'acide nucléique in vivo dans le cerveau de souris nouveau-nées en utilisant une lipopolyamine dans un rapport R = 0,8.

Cet exemple décrit le transfert du plasmide pCMV-luc in vivo sur le cerveau de souris nouveau-nées.

5 30 µg de plasmide pCMV-luc (exemple 1.1.) ont été dilués dans 30 µl NaCl 150 mM stérile (concentration de 1 µg/µl). Ensuite, 0,6 µl de dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) 40 mM, préparé dans de l'éthanol 100 %, ont été ajoutés.

10 Le mélange a été vortexé rapidement et utilisé pour des injections intracérébrales chez des souris nouveau-nées. Pour cela, les souris ont été anesthésiées par le froid (placées sur une feuille d'aluminium en contact avec de la glace), puis 2 µl de mélange (2 µg d'acide nucléique) ont été injectés par souris. Les injections ont été réalisées dans le cortex, à l'aide d'un micromanipulateur et une microseringue reliées à une microélectrode.

15 Les cerveaux ont été prélevés 48 heures plus tard, homogénéisés, centrifugés et le surnageant utilisé pour le dosage de la luciférase. Pour cela, le surnageant a été incubé en présence d'un tampon comprenant de la luciférine, du coenzyme A et de l'ATP, et la lumière émise (généralement pendant 10 secondes) a été mesurée avec un luminomètre (Wood K. (1990) Promega Notes, 28).

20 Les résultats obtenus montrent une activité en unités lumière relative normalisée de 425 RLU/cerveau (moyenne de 10 animaux) (RLU = "relative light unit") lorsque le transfert est réalisé au moyen de la composition de l'invention avec R=0,8, contre une activité normalisée de 100 RLU/cerveau lorsque le transfert est réalisé au moyen du plasmide seul (moyenne de 10 animaux).

EXAMPLE 3 - Comparaison du transfert d'acide nucléique in vivo dans le cerveau de souris nouveau-nées en utilisant une lipopolyamine dans un rapport R = 1,5 et 0,8.

3.1. Transfert du plasmide pCMV-luc

Pour le rapport R=0,8, les conditions sont celles de l'exemple 2. Pour le rapport R=1,5; 30 µg de plasmide pCMV-luc (exemple 1.1.) ont été dilués dans 30 µl NaCl 150 mM stérile (concentration de 1 µg/µl). Ensuite, 1,13 µl de dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) 40 mM, préparé dans de l'éthanol 100 %, ont été ajoutés.

Le mélange a été vortexé rapidement et utilisé pour des injections intracérébrales chez des souris nouveau-nées. Pour cela, les souris ont été anesthésiées par le froid (placées sur une feuille d'aluminium en contact avec de la glace), puis 2 µl de mélange (2 µg d'acide nucléique) ont été injectés par souris. Les 5 injections ont été réalisées dans le cortex, à l'aide d'un micromanipulateur et une microseringue reliée à une microélectrode.

Les cerveaux ont été prélevés 48 heures plus tard, homogénéisés, centrifugés et le surnageant utilisé pour le dosage de la luciférase selon le protocole décrit dans l'exemple 2. Les résultats obtenus montrent une activité normalisée de 89 10 RLU/cerveau (moyenne de 12 animaux) lorsque le transfert est réalisé au moyen de la composition de l'invention avec un rapport $R=1,5$, contre une activité normalisée de 100 RLU/cerveau lorsque le transfert est réalisé au moyen de la composition de l'invention avec un rapport $R=0,8$ (moyenne de 11 animaux).

3.2. Transfert du plasmide pSV-nls LacZ

La même procédure que dans l'exemple 3.1. ci-dessus a été employée pour transfacter le plasmide pSV-nls LacZ comportant le gène LacZ codant pour la β -galactosidase sous contrôle d'un promoteur SV40 (simian virus 40). Cette construction (exemple 1.2.) code aussi pour un peptide de signalisation à localisation nucléaire. L'enzyme β -galactosidase est ainsi transportée vers le noyau et la réaction enzymatique produite par l'acide nucléique est limitée à cette région subcellulaire. 15 Les injections ont été réalisées de la même manière que pour le plasmide pCMV-luc, et les cerveaux ont aussi été prélevés 48 heures post-transfection, fixés dans le paraformaldéhyde (2 %) pendant 24 heures puis traités pour la réaction β -galactosidase. Les cerveaux ont ensuite été examinés pour les sites d'expression, les 20 zones positives coupées au cryostat (15 µm), montées sur lames et photographiées. 25 Dans 2 séries d'expériences indépendantes, trois animaux sur 10 montrent, au niveau des régions situées autour de la zone d'injection, des groupes de cellules dont le noyau présente une coloration bleue très prononcée, caractéristique de l'activité β -galactosidase.

30 **EXEMPLE 4** - Transfert d'acides nucléiques *in vitro* : optimisation du rapport lipopolysaccharide/adjuvant.

Cet exemple décrit le transfert d'acides nucléiques *in vitro* (sur cultures cellulaires) au moyen d'une composition selon l'invention comprenant l'acide

nucléique, une lipopolyamine et un adjuvant (lipide neutre) dans différentes conditions.

10⁵ cellules des lignées fibroblastes 3T3 et hépatome humain HepG2 ont été incubées respectivement en présence de 1 et 2 μ g des plasmides pCMV- β Gal ou pCMV-Luc dans différentes conditions :

- en présence de DOGS dans des rapports de charges R= 1 et 1,5
- en l'absence ou en présence de 1, 2, 5 ou 10 équivalents d'un adjuvant (DOPE).

Le pouvoir transfectant a ensuite été déterminé dans les conditions décrites à l'exemple 2 pour la luciférase, ou par mesure des pourcentages de cellules présentant un coloration bleue prononcée pour l'activité LacZ. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 1 : Activité Luciférase (en RLU/ 10 sec./mg Prot.)

| Conditions/Cellules | 3T3 | HepG2 |
|---------------------------|---------------------|-------------------|
| DOGS (R= 1,5) | 1,7.10 ⁶ | 2.10 ² |
| DOGS (R= 1,5) + 2 eq DOPE | 2.10 ⁷ | 8.10 ³ |

15 Tableau 2 : Activité LacZ

| Rapport de DOGS | Fibroblastes 3T3 | |
|-----------------|------------------|-----|
| | 1 | 1,5 |
| 0 eq DOPE | 0 | 5 |
| 1 eq DOPE | 8 | 30 |
| 2 eq DOPE | 48 | 69 |
| 5 eq DOPE | 15 | 25 |
| 10 eq DOPE | 5 | 10 |

EXEMPLE 5 - Transfert d'acide nucléique in vivo dans le cerveau de souris nouveautées en utilisant une lipopolyamine dans un rapport R = 1 et un lipide neutre.

Dans cet exemple, une solution éthanolique de DOGS à 40 mM a été 20 mélangée avec un volume égal d'une solution de dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) à 80 mM, préparée dans un mélange chloroforme/éthanol (1/5). Ainsi pour un équivalent de DOGS la composition contient deux équivalents de DOPE.

30 µg de plasmide pCMV-luc (exemple 1.1.) ont été dilués dans 30 µl NaCl 150 mM stérile (concentration de 1 µg/µl). Ensuite, 1,5 µl du mélange DOGS/DOPE préparé ci-dessus ont été ajoutés.

La suite du protocole (injections, prélèvements, dosages) est identique à celle décrite à l'exemple 3.1. Les résultats obtenus montrent une activité normalisée de 241 RLU /cerveau (moyenne de 13 animaux) lorsque le transfert est réalisé en présence de l'adjuvant (lipide neutre), contre une activité normalisée de 100 RLU/cerveau lorsque le transfert est réalisé en présence du DOGS seul, dans le même rapport de charges R = 1 (moyenne de 13 animaux).

10 **EXEMPLE 6** - Transfert d'acide nucléique *in vivo* dans le cerveau de souris nouveautées en utilisant une lipopolyamine dans un rapport R = 1,25 et un lipide neutre.

Dans cet exemple, une solution éthanolique de DOGS à 40 mM a été mélangée avec un volume égal d'une solution de dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) à 80 mM, préparée dans un mélange chloroforme/éthanol (1/5). Ainsi pour 15 un équivalent de DOGS la composition contient deux équivalents de DOPE.

30 µg de plasmide pCMV-luc (exemple 1.1.) ont été dilués dans 30 µl NaCl 150 mM stérile (concentration de 1 µg/µl). Ensuite, 1,87 µl du mélange DOGS/DOPE préparé ci-dessus ont été ajoutés.

La suite du protocole (injections, prélèvements, dosages) est identique à celle décrite à l'exemple 3.1. Les résultats obtenus montrent une activité normalisée de 405 RLU/cerveau (moyenne de 8 animaux) lorsque le transfert est réalisé en présence de l'adjuvant, contre une activité normalisée de 100 RLU/cerveau (moyenne de 8 animaux) lorsque le transfert est réalisé en présence du DOGS seul, dans le même rapport de charges R = 1,25.

25 **EXEMPLE 7** - Transfert d'acide nucléique *in vivo* dans le cerveau de souris nouveautées en utilisant une lipopolyamine dans un rapport R = 1,5 et un lipide neutre.

Dans cet exemple, une solution éthanolique de DOGS à 40 mM a été mélangée avec un volume égal d'une solution de dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) à 80 mM, préparée dans un mélange chloroforme/éthanol (1/5). Ainsi pour 30 un équivalent de DOGS la composition contient deux équivalents de DOPE.

30 µg de plasmide pCMV-luc (exemple 1.1.) ont été dilués dans 30 µl NaCl 150 mM stérile (concentration de 1 µg/µl). Ensuite, 2,26 µl du mélange DOGS/DOPE préparé ci-dessus ont été ajoutés.

La suite du protocole (injections, prélèvements, dosages) est identique à celle décrite à l'exemple 4.1. Les résultats obtenus montrent une activité normalisée de 165 RLU/cerveau (moyenne de 10 animaux) lorsque le transfert est réalisé au moyen d'une composition de l'invention contenant un adjuvant (lipide neutre), contre une activité normalisée de 100 RLU/cerveau (moyenne de 11 animaux) lorsque le transfert est réalisé au moyen du DOGS seul, dans le même rapport de charges (R=1,5).

EXEMPLE 8 - Transfert d'acide nucléique *in vivo* chez la souris en utilisant une lipopolyamine dans un rapport R = 3.

Cet exemple décrit le transfert du plasmide pCMV-luc *in vivo* sur des souris adultes. Les expériences ont été réalisées sur des souris adultes anesthésiées au pentobarbital.

8.1. Transfert par voie veineuse

Pour chaque souris, 100 µg de plasmide pCMV-luc ont été dilués dans 100 µl de NaCl 150 mM. Ensuite, 7,5 µl de DOGS 40 mM ont été ajoutés à la solution. La veine jugulaire des souris a ensuite été exposée par dissection, et la solution ci-dessus injectée dans la jugulaire en direction du cœur. La peau a ensuite été refermée avec des agrafes. 48 heures après l'injection, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale, et le foie, les poumons, la rate, le cerveau, les reins et un échantillon de muscle squelettique ont été prélevés. Après homogénéisation et centrifugation, les surnageants ont été utilisés pour doser la luciférase. Cette expérience a été réalisée sur 4 souris. Aucune expression de la luciférase n'a été mise en évidence dans les différents tissus testés.

8.2. Transfert par voie intramusculaire

60 µg de plasmide pCMV-luc ont été dilués dans 300 µl de NaCl 150 mM. Ensuite, 4,5 µl de DOGS 40 mM ont été ajoutés à la solution. 50 µl du mélange préparé ci-dessus (10 µg d'ADN) ont ensuite été injectés pour chaque souris, à travers la peau, dans le muscle antérieur tibial. 48 heures après l'injection, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale, et les muscles injectés ont été prélevés. Après

homogénéisation et centrifugation, les surnageants ont été utilisés pour doser la luciférase. Cette expérience a été réalisée sur 6 souris. Aucune expression de la luciférase n'a été décelée.

5 EXEMPLE 9 - Transfert d'acide nucléique *in vivo* chez la souris en utilisant une lipopolyamine dans un rapport R = 4.

Cet exemple décrit le transfert du plasmide pCMV-luc *in vivo* sur des souris adultes. Les expériences ont été réalisées sur des souris adultes anesthésiées au pentobarbital.

9.1. Transfert par voie veineuse

10 Pour chaque souris, 100 µg de plasmide pCMV-luc ont été dilués dans 100 µl de NaCl 150 mM. Ensuite, 10 µl de DOGS 40 mM ont été ajoutés à la solution. La veine jugulaire des souris a ensuite été exposée par dissection, et la solution ci-dessus injectée dans la jugulaire en direction du cœur. La peau a ensuite été refermée avec des agrafes. 48 heures après l'injection, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale, et le foie, les poumons, la rate, le cerveau, les reins et un échantillon de muscle squelettique ont été prélevés. Après homogénéisation et centrifugation, les surnageants ont été utilisés pour doser la luciférase. Cette expérience a été réalisée sur 4 souris. Aucune expression de la luciférase n'a été mise en évidence dans les différents tissus testés.

20 9.2. Transfert par voie intramusculaire

25 60 µg de plasmide pCMV-luc ont été dilués dans 300 µl de NaCl 150 mM. Ensuite, 6 µl de DOGS 40 mM ont été ajoutés à la solution. 50 µl du mélange préparé ci-avant (10 µg d'ADN) ont ensuite été injectés pour chaque souris, à travers la peau, dans le muscle antérieur tibial. 48 heures après l'injection, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale, et les muscles injectés ont été prélevés. Après homogénéisation et centrifugation, les surnageants ont été utilisés pour doser la luciférase. Cette expérience a été réalisée sur 6 souris. Aucune expression de la luciférase n'a été décelée.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique et une lipopolyamine caractérisée en ce que le rapport (R) charges positives de la lipopolyamine sur charges négatives de l'acide nucléique est inférieur ou égal à 2.
- 5 2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que la lipopolyamine comprend au moins une région hydrophile polyamine de formule générale $H_2N\text{--}(\text{CH})_m\text{--NH}\text{--})_n\text{--H}$ dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 2 et n est un nombre entier supérieur ou égal à 1, m pouvant varier entre les différents groupes de carbone compris entre 2 amines, et une région lipophile qui peut 10 être une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, du cholestérol, un lipide naturel ou un lipide synthétique capables de former des phases lamellaires ou hexagonales.
3. Composition selon la revendication 2 caractérisée en ce que m est compris entre 2 et 6 inclusivement et n est compris entre 1 et 5 inclusivement.
- 15 4. Composition selon la revendication 2 caractérisée en ce que la région polyamine est représentée par la spermine ou un analogue de la spermine ayant conservé ses propriétés de liaison à l'ADN.
5. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que la lipopolyamine est choisie parmi le DOGS et le DPPES.
- 20 6. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.
7. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.
8. Composition selon la revendication 6 ou 7 caractérisée en ce que l'acide nucléique est modifié chimiquement.
- 25 9. Composition selon la revendication 6 à 8 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un antisens.
10. Composition selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que le rapport R est compris entre 0,1 et 1,9.

12. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce que le rapport R est compris entre 0,5 et 1,5.

5 13. Composition comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et d'améliorer son pouvoir transfectant.

14. Composition selon la revendication 13 caractérisée en ce que l'adjuvant est un ou plusieurs lipides neutres.

10 15. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les lipides synthétiques ou naturels, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques.

16. Composition selon la revendication 15 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont des lipides à 2 chaînes grasses.

15 17. Composition selon la revendication 15 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphos-phatidyléthanolamine (POPE), le di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamine ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les 20 cérébroside (tels que notamment les galactocérébroside), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) et les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

18. Composition selon les revendications 13 à 17 caractérisée en ce que la lipopolyamine est définie selon les revendications 2 à 5.

25 19. Composition selon la revendication 13 caractérisée en ce que le rapport (R) charges positives de la lipopolyamine sur charges négatives de l'acide nucléique est inférieur ou égal à 2.

20. Composition selon l'une des revendications 13 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,1 à 20 équivalents d'adjuvant pour 1 équivalent de lipopolyamine, et, plus préférentiellement, de 1 à 5.

21. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes 5 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.

22. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Search Report No
PCT/FR 95/00022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/87 A61K47/48 A61K48/00 A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| X | <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.86, September 1989, WASHINGTON US pages 6982 - 6986 J.-P. BEHR ET AL 'Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA' *see the whole document plus in particular figure 4*</p> <p>---</p> <p>-/-</p> | 1-6, 11, 12 |

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report

14 March 1995

29.03.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL-2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Corne, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/FR 95/00022

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-------------------------|
| X | METHODS IN ENZYMOLOGY, vol.217, 1993 pages 599 - 618 J.P. LOEFFLER ET AL 'Gene transfer into primary and established mammalian cell lines with lipopolyamine-coated DNA' *see the whole document and plus in particular figure 8, pages 615-617 * --- JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, vol.3, no.1, 1993, NEW YORK US pages 17 - 30 XIANG GAO ET AL 'Cationic liposomes and polymers for gene transfer' see page 25, line 9 - page 26, line 15 --- | 1-6, 11, 12 13-17 |
| A | THE INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol.35, no.4, December 1991 pages 481 - 484 B.A. DEMENEIX ET AL 'Gene transfer into intact vertebrate embryos' cited in the application *see the whole document plus in particular page 482 right-hand column* --- | 1-6 |
| A | HUMAN GENE THERAPY, vol.3, 1992 pages 267 - 275 M.J. STEWART ET AL 'Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes : Safety and acute toxicity in mice' *discussion, page 269 left-hand column* column --- WO,A,94 00569 (GENPHARM INTERNATIONAL, INC.) 6 January 1994 see page 24 - page 27 see claims see page 32, line 9 - line 24 --- | 1,6, 13-17,20 |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.86, August 1989, WASHINGTON US pages 6077 - 6081 R.W. MALONE ET AL 'Cationic liposome-mediated RNA transfection' see page 6078, right column --- | 1,7,13 |
| A | WO,A,93 24640 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9 December 1993 *see the whole document plus in particular examples 22-24,26-27* ----- | 1,6,10, 13-17 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00022

| Parent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------|---------------------|
| WO-A-9400569 | 06-01-94 | AU-B- | 4541093 | 24-01-94 |
| WO-A-9324640 | 09-12-93 | AU-B- | 3467193 | 19-07-93 |
| | | AU-B- | 4407593 | 30-12-93 |
| | | AU-B- | 4528493 | 04-01-94 |
| | | CA-A- | 2126101 | 24-06-93 |
| | | CA-A- | 2134773 | 09-12-93 |
| | | EP-A- | 0625207 | 23-11-94 |
| | | WO-A- | 9312240 | 24-06-93 |
| | | WO-A- | 9325673 | 23-12-93 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der : Internationale No
PCT/FR 95/00022

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/87 A61K47/48 A61K48/00 A61K9/127

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications vistées |
|-----------|---|--------------------------------|
| X | <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.86, Septembre 1989, WASHINGTON US pages 6982 - 6986 J.-P. BEHR ET AL 'Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA' * le document en entier plus particulièrement la figure 4 *</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-6, 11, 12 |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 Mars 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29.03.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Cornec, N

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Date Internationale No

PCT/FR 95/00022

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X | METHODS IN ENZYMOLOGY, vol.217, 1993 pages 599 - 618 J.P. LOEFFLER ET AL 'Gene transfer into primary and established mammalian cell lines with lipopolyamine-coated DNA' *le document en entier et plus particulièrement la figure 8 , page 615-617 * --- | 1-6,11, 12 |
| X | JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, vol.3, no.1, 1993, NEW YORK US pages 17 - 30 XIANG GAO ET AL 'Cationic liposomes and polymers for gene transfer' voir page 25, ligne 9 - page 26, ligne 15 --- | 13-17 |
| A | THE INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol.35, no.4, Décembre 1991 pages 481 - 484 B.A. DEMENEIX ET AL 'Gene transfer into intact vertebrate embryos' cité dans la demande * le document en entier plus particulièrement page 482 colonne de droite * | 1-6 |
| A | HUMAN GENE THERAPY, vol.3, 1992 pages 267 - 275 M.J. STEWART ET AL 'Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes : Safety and acute toxicity in mice' * discussion, page 269 colonne de gauche * --- | 1,6, 13-17,20 |
| A | WO,A,94 00569 (GENPHARM INTERNATIONAL, INC.) 6 Janvier 1994 voir page 24 - page 27 voir revendications voir page 32, ligne 9 - ligne 24 --- | 1-20 |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.86, Août 1989, WASHINGTON US pages 6077 - 6081 R.W. MALONE ET AL 'Cationic liposome-mediated RNA transfection' voir page 6078, colonne de droite --- | 1,7,13 |
| 2 A | WO,A,93 24640 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9 Décembre 1993 * le document en entier plus particulièrement exemple 22-24,26-27 * ----- | 1,6,10, 13-17 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

| | |
|-----|-------------------|
| De. | Internationale No |
| | PCT/FR 95/00022 |

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | Date de publication |
|---|------------------------|---|---------|------------------------|
| WO-A-9400569 | 06-01-94 | AU-B- | 4541093 | 24-01-94 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9324640 | 09-12-93 | AU-B- | 3467193 | 19-07-93 |
| | | AU-B- | 4407593 | 30-12-93 |
| | | AU-B- | 4528493 | 04-01-94 |
| | | CA-A- | 2126101 | 24-06-93 |
| | | CA-A- | 2134773 | 09-12-93 |
| | | EP-A- | 0625207 | 23-11-94 |
| | | WO-A- | 9312240 | 24-06-93 |
| | | WO-A- | 9325673 | 23-12-93 |
| | ----- | ----- | ----- | ----- |

